

Aus dem Städtischen Krankenhaus Berlin-Neukölln

I. Innere Abteilung

Dirigierender Arzt: Professor Dr. med. Klaus Holldack

DIE PAS – REAKTION IN
DER KNOCHENMARKKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hendrik Bruns

aus Kleve

1969

AUS DEM STÄDTISCHEN KRANKENHAUS BERLIN - NEUKÖLLN

I. INNERE ABTEILUNG

DIRIGIERENDER ARZT: PROFESSOR DR. MED. KLAUS H O L L D A C K

DIE PAS - REAKTION IN
DER KNOCHENMARKKULTUR

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

AN DER

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

HENDRIK BRUNS AUS KLEVE

Dekan : Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann
Referent : Oberarzt Dr. med. Irene Boll
Korreferent: Professor Dr. med. Wilhelm Masshoff



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien
Universität Berlin.

Promoviert am : 26. Juni 1969

DISPOSITION

	Seite:
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODE	7
III. ERGEBNISSE	13
IV. DISKUSSION	28
V. ZUSAMMENFASSUNG	32
VI. LITERATURVERZEICHNIS	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548620_0050

EINLEITUNG

Die Bezeichnung "PAS" ist nach der Literatur eine Abkürzung für Perjodic - Acid - Schiff - Reaktion. Bei der PAS-Färbung findet zuerst eine Oxydation durch die Perjodsäure statt, danach eine Reduktion durch das Schiff'sche Reagens, wodurch die charakteristische rote Farbe entsteht. Dadurch wird nicht nur - wie seit langem bekannt - Glykogen angefärbt, sondern mit zunehmend verfeinerten Untersuchungsmethoden stieg die Zahl der Substanzen, die durch die PAS-Färbung darstellbar sind. Grundsätzlich läßt sich sagen, daß sämtliche PAS-positiven Substanzen organischer Natur sind. Die folgende Aufstellung der PAS-positiv reagierenden Substanzen entstammt dem "Biochemischen Taschenbuch" von L e h n a r t z (14).

- 1) Glycogen
- 2) Stärke
- 3) Zellulose
- 4) Neutrale Mukopolysaccharide
- 5) Muko- und Glykolipide
- 6) Glykoproteide
- 7) Ungesättigte Neutralfette

Allen diesen Substanzen ist gemeinsam, daß sie durch das starke Oxydationsmittel, die Perjodsäure, in Aldehyde umgewandelt werden, die mit dem Schiff'schen Reagens eine rot gefärbte Verbindung eingehen.

Mikroskopisch sieht man diese rosa bis rot, manchmal violett angefärbten Substanzen in den Blutzellen außerhalb des Zellkernes im Zytoplasma, niemals im Zellkern (9). Diese Aussage trifft sowohl für die Zellen der

Erythropoese als auch der Granulopoese zu. Im gesunden Knochenmark sind die Zellen der Erythropoese PAS-negativ⁽¹⁵⁾. Eine Ausnahme sollen die Erythroblasten der Neugeborenen darstellen, in denen Kohlenhydrate von Glykogenatur im Zytoplasma nachweisbar sind⁽¹⁵⁾.

In der Granulopoese steigt mit zunehmender Reifung die Beladung der Zellen mit PAS-positiven Substanzen⁽¹⁵⁾. So reagiert der Segmentkernige normalerweise am stärksten PAS-positiv. Merker⁽¹⁵⁾ stellt fest, daß in den Myeloblasten grundsätzlich Glykogen vorhanden ist, aber oft nur in Form feinsten Granula sichtbar. Der Promyelocyt reagiert stärker granulär PAS-positiv. Das Verhalten der Myelocyten ist nach Merker⁽¹⁵⁾ uneinheitlich: Manche Zellen geben eine schwächere Reaktion als die Promyelocyten, manche zeigen kräftig angefärbte und ziemlich dicht liegende Granula. Ähnliches gilt für die Metamyelocyten. Die entscheidende Zunahme der PAS-Intensität ist bei den Stabkernigen Leukocyten zu beobachten, deren Farbniederschläge oft so dicht liegen, daß häufig eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas infolge Konfluenz der einzelnen Farbstoffpartikel eintritt. Diese Konfluenz ist besonders intensiv bei den reifen Segmentkernigen, welche die stärkste PAS-Reaktion aufweisen.

Wie bei der Granulopoese zeigen die Lymphocyten nach Astaldi, Verga und Hayhoe⁽¹⁵⁾ mit zunehmender Reife eine stärkere diffuse PAS-Reaktion. Im Unterschied zu den Zellen der Granulopoese, besonders den reiferen, enthalten die Lymphocyten jedoch weniger PAS-positive Substanzen. Nach Astaldi und Mitarbeitern⁽¹⁵⁾ muß im normalen Knochenmark nicht jeder Lymphoblast und Lymphocyt unbedingt PAS-positiv reagieren. Die PAS-Positivität der Lymphocyten untersucht Undritz⁽¹⁸⁾ bei 83 Fällen mit gesundem Knochenmark und findet, daß 21 % (12 - 47 %) der Lymphocyten PAS-positiv reagieren, wobei

kein Geschlechtsunterschied festzustellen ist.

Die Monocytenreihe weist auch deutliche Schwankungen in der PAS-Reaktion auf. Nach M e r k e r ⁽¹⁵⁾ ist der Grad der Anfärbbarkeit etwa so stark wie bei den Promyelocyten. Auch bei dieser Zellklasse steigt die Anfärbbarkeit mit zunehmender Reife. Der Monoblast ist entweder überhaupt nicht oder ganz schwach und der reife Monocyt diffus rot angefärbt ⁽⁵⁾.

Die Plasmazellen sind im normalen Knochenmark niemals PAS-positiv ⁽¹⁵⁾.

Die Megakaryocyten sind mit der PAS-Reaktion sehr stark angefärbt. Bei der Ausreifung hat der Megakaryocyt in dem Stadium, kurz bevor er Thrombocyten ausstößt, grobschollige, intensiv rote Agglomerate PAS-positiver Substanzen, die so stark angefärbt sind wie die Thrombocyten im peripheren Blut ⁽¹⁵⁾.

So wie die Zellen des normalen Knochenmarkes in der PAS-Färbung bestimmte Gesetzmäßigkeiten aufweisen, zeigt pathologisch verändertes Knochenmark Abweichungen von der Norm.

Treten in den Zellen der roten Reihe bei verschiedenen Krankheiten PAS-positive Strukturen auf, so sind diese meist in den unreifen jungen Zellen zu finden ⁽¹⁵⁾. A s t a l d i stellte 1952 Granula PAS-positiver Strukturen in den Erythroblasten bei einer Thalassämia major fest. Er und seine Mitarbeiter machten wenig später die gleiche Beobachtung bei der akuten Erythämie, der di Guglielmo'schen Krankheit ⁽¹⁾. In den Erythroblasten wurden außerdem bei der Vitamin B₆-Mangelanämie PAS-positive Strukturen beobachtet, bei der Myelosklerose ⁽¹⁵⁾. Das Auftreten PAS-positiver Strukturen bei der sideroachrestischen Anämie ⁽¹⁵⁾ liegt nicht in jedem Krankheitsfall vor. In sofern ist die Störung im Eisenstoffwechsel

bei dieser Krankheit von dem Auftreten PAS-positiver Strukturen unabhängig ⁽¹⁵⁾. Ebenfalls wurde ein nur geringer PAS-Gehalt in den Erythroblasten bei Eisenmangel, perniziösen, aregeneratorischen und aplastischen Anämien festgestellt ⁽¹⁵⁾. Schwache oder mittlere Stärke von PAS-Positivität werden von H a y h o e ⁽⁸⁾ im Falle einer foetalen hämolytischen Anämie, bei einer erworbenen hämolytischen Anämie, bei der Hodgkinschen Erkrankung und beim Lymphosarkom berichtet ⁽⁸⁾. Stärkerer Gehalt an PAS-positiven Substanzen liegt in der Erythropoese bei der akuten und chronischen Leukämie vor ⁽¹⁰⁾. Patienten, die einer Therapie mit ionisierenden Strahlen ausgesetzt sind, weisen ebenfalls erhöhte PAS-Positivität in den Erythroblasten auf ⁽²⁾.

In der Granulopoese kommen im Gegensatz zur Erythropoese - wie oben dargelegt - PAS-positive Substanzen im normalen Knochenmarkbild vor. Abweichungen sind daher in zwei Richtungen möglich. Einmal das verminderte und zum anderen das vermehrte Auftreten der PAS-positiven Strukturen in den Zellen. So ist nach M e r k e r ⁽¹⁵⁾ in den Stabkernigen und Segmentkernigen Granulocyten bei Leukocytosen und bei Morbus Hodgkin eine deutliche Verstärkung der PAS-Anfärbbarkeit zu verzeichnen, welche seiner Meinung nach auf den entzündlichen Prozeß hinweisen könnte. Eine vermehrte PAS-Reaktion der Leukocyten wird von Z k r a b a l o ⁽¹⁷⁾ und M e r k e r ⁽¹⁵⁾ im Blut von Diabetikern festgestellt. Eine deutliche Verminderung glykogenbeladener Leukocyten findet sich nach M e r k e r in manchen Zellen bei Agranulocytose. Außerdem beobachtet er, daß im Staseblut bei vielen Leukocyten schon nach einigen Tagen ein deutlicher Glykogenschwund zu verzeichnen ist. Bei Myelosklerose und Polycythämia vera ist ein noch normaler Glykogengehalt in den Granulocyten nachweisbar (M e r k e r und C h u m i u H u i) ⁽¹⁵⁾. Bei der chronisch-myeloischen Leukämie liegt aber eine deutliche Abnahme der PAS-Positivität vor. Mit Hilfe semiquantitativer

Untersuchungsmethoden stellt G a h r t o n ⁽⁷⁾ übereinstimmend mit M e r k e r ⁽¹⁵⁾ fest, daß die PAS-Positivität bei chronischer Myelose erniedrigt ist. Mit der gleichen semiquantitativen Methode untersucht G a h r t o n ⁽⁶⁾ an einzelnen Zellen in zwei Fällen von Polycythämia vera die Granulopoese und kommt zu dem Ergebnis, daß bei dieser Krankheit in den Granulocyten keine erhöhte PAS-Positivität vorliegt.

Auch in den lymphatischen Zellen zeigen sich bei pathologischen Veränderungen im Knochenmark Abweichungen der PAS-Positivität. Bei chronischer Lymphadenose haben die Lymphocyten eine erhöhte PAS-Positivität ⁽¹⁵⁾. Nach A s t a l d i und V e r g a ⁽¹³⁾ ist die PAS-Positivität am stärksten in jugendlichen Lymphocyten bei akuter Lymphoblastenleukose. Q u a g l i n o und H a y h o e bestätigen zwar nicht das verstärkte Auftreten PAS-Positiver Substanzen bei chronischer Lymphadenose, geben aber zu, daß bei erfolgreicher Behandlung der chronischen Lymphadenose und auch des Lymphosarkoms eine Verminderung der PAS-Positivität der Lymphocyten zu erkennen ist, während die erhöhte PAS-Positivität der Lymphocyten bei Morbus Hadgkin nach der Behandlung unverändert bleibt ⁽¹⁵⁾. Eine erhöhte PAS-Positivität der Lymphocyten zeigt sich auch bei Gargyolismus ⁽¹⁵⁾. Insgesamt wird das verstärkte Auftreten PAS-positiver Substanzen in den Lymphoblasten und Lymphocyten für ein Symptom des gesteigerten Zellstoffwechsels im lymphatischen System gehalten, ohne daß ein stärkerer Ausfall der PAS-Reaktion als Kennzeichen einer leukämischen Zellproliferation angesehen werden kann ⁽¹⁵⁾.

Die Monocyten, die, wie eingangs ausgeführt, im normalen Knochenmark erheblichen Schwankungen in der Anfärbbarkeit bezüglich ihrer PAS-Positivität unterliegen, weisen nach B r u h n ⁽⁵⁾ bei unreifzelliger monocytärer Leukose eine erhöhte PAS-Positivität auf. B r u h n ⁽⁵⁾ stellt weiter fest, daß bei Monoblastenleukämien neben der zytoplasmatischen Reaktion eine feine Granulierung in den Monocyten auftreten kann, so daß die Abgrenzung gegenüber Lymphoblasten schwierig wird.

Bei der geschwulstförmigen Proliferation der Plasmazellen, dem Plasmacytom, zeigt sich ebenfalls eine Veränderung der Anfärbbarkeit. Die Plasmazellen, die normalerweise PAS-negativ sind, weisen bei dieser Krankheit feine dunkelblaue Granula im Zytoplasma auf, die PAS-positiv sind und den Russel'schen Körperchen entsprechen sollen ⁽¹⁵⁾.

Die Megakaryocyten haben bei der idiopathischen thrombopenischen Purpura eine wesentliche Verminderung der PAS-positiven Substanzen ⁽¹⁵⁾. Der verminderte Gehalt an PAS-positiven Substanzen in Megakaryocyten läßt sich auch bei der perniziösen Anämie und in den Frühstadien der akuten Leukose beobachten ⁽¹⁵⁾. Gesteigerte PAS-Anfärbbarkeit zeigt sich bei splenopathischer Markhemmung, zum Beispiel bei Milzvenenthrombose ⁽¹⁵⁾. Nach M e r k e r ⁽¹⁵⁾ drückt sich bei den Megakaryocyten die Zellfunktion in der PAS-Reaktion deutlicher als bei jeder anderen Zellkategorie aus. Größere PAS-Positivität bedeutet normale oder gesteigerte Funktionsleistung, verminderte PAS-Anfärbbarkeit drückt das Gegenteil aus ⁽¹⁵⁾.

Alle diese Beobachtungen in der PAS-Reaktion bei Knochenmarkzellen beziehen sich auf das frisch entnommene Knochenmark. Über das Knochenmark in vitro und das Verhalten der PAS-Positivität während der Kultivierung liegen weitaus weniger Arbeiten vor. H e r t l ⁽¹¹⁾ stellt zytochemische Untersuchungen an Knochenmarkzellen in der Kultur an und beobachtet, daß bei allen Zellen des menschlichen Knochenmarkes nach einer Züchtungsdauer von 24 Stunden keine PAS-Positivität mehr vorliegt. A u n e , G a r t n e r und W a s e stellten fest, daß der größte Verlust der PAS-Positivität nach 110 Stunden Züchtungsdauer erfolgt ⁽³⁾. Diese Beobachtung wurde allerdings nicht bei Knochenmarkzellen, sondern bei Granulocyten im peripheren Blut gemacht.

Die vorliegende Arbeit untersucht die PAS-Reaktion an Knochenmarkzellen in vitro und in vivo bis zu einer Züchtungsdauer von drei Tagen in der Koagulumkultur, da nach M e r k e r (1968), H e c k n e r (1956) u. a. der Glycogengehalt mit der Stoffwechselsituation der Zellen zu korrelieren ist.

MATERIAL UND METHODE

Das Knochenmark für die Versuche wurde aus dem Sternum der Patienten entnommen. Ein Teil des gewonnenen Materials wurde sofort ausgestrichen, der größere Teil kultiviert.

Auf ein Koagulum von einem Teil Corhomon, vier Teilen Hank'scher Lösung und fünf Teilen Nativplasma desselben Patienten wurden die Markbröckel in Hohlsliffobjektträgern im Brutschrank bei 37 °C gezüchtet. Diese Kultivierungstechnik nach Boll⁽⁴⁾ lehnt sich an die Methode von Carrel an. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden Züchtungsdauer wurden die Knochenmarkkulturen ausgestrichen. Für einen Teil der Versuchsserie wurde die Kultivierungstechnik etwas verändert: Die Hank'sche Nährlösung erhielt einen erhöhten Glukosezusatz von 5 % gegenüber dem üblichen Glukosegehalt von 0,1 o/oo.

Die Methode, nach der die Präparate angefärbt wurden, ist eine modifizierte Hotchkiss-Mc Manus PAS-Reaktion⁽¹⁴⁾. Modifiziert ist die PAS-Reaktion durch die Einwirkzeiten und die Zusammensetzung der Reagenzien.

Nach vorausgehenden Färbungsversuchen mit verschiedenen Variationen der PAS-Reaktion wurde schließlich die Methode entwickelt, die vergleichbare Ergebnisse liefert, nicht zu zeitraubend ist und damit auch für den Routinebetrieb infrage kommt.

Die einzelnen Schritte der von uns gewählten PAS-Reaktion sind:

- | | |
|----------------------------|----------------------|
| 1) Lufttrocknen | mindestens zwei Tage |
| 2) Fixieren mit Methanol | 10 Minuten |
| 3) Mit aqua dest. abspülen | |
| 4) 0,5 % Perjodsäure | 8 Minuten |

- | | |
|---|------------|
| 5) Mit aqua dest. abspülen | |
| 6) Schiff'sche Reagens | 20 Minuten |
| 7) Mit SO_2 -Wasser gut abspülen | |
| 8) Mit aqua dest. gut abspülen | |
| 9) Löfflers Methylenblau | 1 Minute |
| 10) Mit aqua dest. gut abspülen | |

Zu Punkt 1:

Das gute Abrocknen der Marksubstanz auf den Objektträgern ist sehr wichtig. Hat das Material noch zu viel Feuchtigkeit und ist nicht genügend Knochenmark auf dem Objektträger angetrocknet, so besteht die Gefahr, daß sich die Zellen während der Färbung ablösen. Nach unserer Erfahrung müssen die Ausstriche mindestens zwei Tage in staubfreier Atmosphäre bei Zimmertemperatur trocknen, bevor sie angefärbt werden.

Zu Punkt 4:

Eine vorangehende Testreihe mit 0,7 % Perjodsäure zeigte eine allzu heftige und rasche Oxydation, die fast sämtliche Zellen diffus rot erscheinen ließ und keine Differenzierungsmöglichkeit in der PAS-Intensität gab. Die Oxydation mit 0,5 % Perjodsäure zeigte befriedigende Differenzierungsmöglichkeit.

Zu Punkt 6:

Die Zusammensetzung des Schiff'schen Reagens weicht etwas von dem meist in der Literatur angegebenen ab. Die Anteile sind:

- 1) 2,5 g basischer Pararosanilin
- 2) 75,0 ml n-HCL
- 3) 425,0 ml aqua dest.
- 4) 2,5 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Kaliumthiosulfat)

Diese Reagenzien werden gemischt und bis zum Aufkochen erhitzt. Anschließend läßt man etwas abkühlen und filtriert die Lösung. Die Vorteile dieses Schiff'schen Reagens gegenüber in der Literatur angegebenen sind auffallend: Zusatz von Aktivkohle, Aufbewahren bei niedrigen Temperaturen und in Dunkelheit, sonst Voraussetzungen für die längere Brauchbarkeit des Schiff'schen Reagens, sind hierbei nicht notwendig. Unter der angegebenen Aufbereitung war dieses Schiff'sche Reagens nach unseren Beobachtungen über 12 Monate lang haltbar.

Über die Brauchbarkeit sagt die Farbe des Reagens etwas aus. Ist es gelblich bis schwach grün, so ist es brauchbar. Erfolgt ein Farbumschlag ins Orange bis Violett, so ist es unbrauchbar.

Zu Punkt 7:

Die Zusammensetzung des SO_2 -Wassers erfolgte nach einer Empfehlung von Spannhof (16).

- 1) 6 ml 10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Natriumthiosulfat)
- 2) 5 ml 1 n-HCL
- 3) 100 ml aqua dest.

Die Reagenzien werden gut durchgemischt. So zubereitet, ist das SO_2 -Wasser sofort gebrauchsfertig. Ist die Lösung glasklar, so ist sie zu gebrauchen. Erfolgt ein Farbumschlag ins Rosa bis Orange, so ist das Reagens zu verwerfen. Bei unseren Versuchen war das SO_2 -Wasser zwei bis drei Monate lang haltbar.

Zu Punkt 9:

Als Gegenfärbung wurde Löffler's Methyleneblau verwendet, weil es einen besonders schönen Farbkontrast ergibt. Zu konzentrierte Lösungen sind wegen der Gefahr der Überfärbung nicht zu verwenden. Aus diesem Grunde ist eine

Verdünnung von Löfflers Methylenblau mit aqua dest. im Verhältnis 1 : 1 erforderlich.

Zur Ausführung der Färbung sei noch erwähnt, daß stets die Sofortausstriche mit den jeweiligen 24, 48 und 72-Stunden-Präparaten der Knochenmarkkulturen desselben Patienten in einem Arbeitsgang gefärbt wurden. Die gleichen Bedingungen wurden eingehalten, um die Unterschiede der Anfärbbarkeit durch technische Fehlerquellen bei der Färbung ausschließen zu können.

Die gefärbten Präparate wurden nach einem besonderen System ausgewertet. Ausgezählt wurden insgesamt 11 Versuchsserien zu je vier Präparaten. Jede Versuchsreihe bestand aus einem Sofortausstrich und drei Präparaten aus den Knochenmarkkulturen, die jeweils einen, zwei und drei Tage lang gezüchtet wurden, danach ausgestrichen und angefärbt wurden. Wir versuchten, pro Präparat mindestens 1000 Zellen auszuzählen. Bei einigen Ausstrichen war es nicht möglich, diese Zahl zu erreichen, obwohl 57 Versuchsreihen angesetzt worden waren, aus denen die Versuche mit dem ergiebigsten Zellmaterial ausgewählt wurden.

Gezählt wurde mit einem binokularen Mikroskop der Firma Leitz, Wetzlar, einer Ölimmersion, 90 - 100-fach, Aperturblende 1,32 und 12-fachen Okularen. Zur Technik des Mikroskopierens sei gesagt, daß bei zellreichen Präparaten ausschnittsweise gezählt wurde, um möglichst keine Zellnester zu erfassen. Bei Präparaten, die nicht so zellreich waren, wurden die Ausstriche im Z-System durchgemustert, um genügend Zellen zu erfassen.

Ausgewertet wurden die Zellen der Erythropoese, die Zellen der Granulopoese, außerdem die Plasmazellen, die Lymphocyten, die Monocyten und die Megakaryocyten. Neben dieser Einteilung war eine weitere Klassifizierung notwendig, um den Grad der PAS-Positivität auszudrücken. Diesbezüglich wurde die von K a h n ⁽¹²⁾ beschriebene Methode in Abwandlung übernommen,

der die verschiedene Stärke der PAS-Positivität wie folgt unterteilt:

Die nicht positiven Zellen bekommen die Stärke 0=negativ, danach gliedern sich mit zunehmender PAS-Positivität die Stufen:

schwachrosa	= +
granular-rosa	= ++
grob-schollig rot bis violett	= +++

Wir setzen statt der Klassifizierung +, ++, +++ die Zahlen 100, 200, 300 ein.

Anhand der ermittelten Färbeindizes wurde anschließend die Signifikanz berechnet. Die Formel, die wir benutzten, lautet

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

In dieser Formel ist $\sum$ = Summe, s = Varianz.

Mit Hilfe des "t-Testes" wird geprüft, ob der errechnete Index in den Kulturausstrichen zufällig ist, oder ob mit großer Wahrscheinlichkeit eine tatsächliche Steigerung bzw. Abnahme der PAS-Indizes vorliegt. Wir testen die Steigerung bzw. Abnahme des Indexwertes x_i im Originalausstrich zu dem Index in den Kulturausstrichen. Dabei wird angenommen, daß die Zahl x_i einer normalverteilten Grundgesamtheit entnommen ist.

Wenn $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ der Mittelwert

und $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$ die Streuung ist,

dann ist:

$$t = \sqrt{n} \frac{\bar{x} - n}{s} \quad \text{--t--verteilt mit}$$

$n-1$ Freiheitsgraden.

Es wird getestet, ob $\bar{x}$ nur zufällig von null verschieden ist. n wird deshalb = 0 gesetzt. Als Konfidenzzahl soll 99 % gewählt werden. Aus einer Tabelle für die t-Verteilung wird die zugehörige Vertrauensgrenze c so ermittelt, daß die Wahrscheinlichkeit für $t > c$ zu 1 % ausfällt.

Ist ein berechneter t-Wert größer als diese Zahl c , so wird die Hypothese abgelehnt, d.h., die Steigerung, bzw. Abnahme des Index ist signifikant.

Für $n = 11$ findet sich $c = 2,90$

Für $n = 3$ " " $c = 3,90$

Die Berechnung, ob eine signifikante Änderung der Indexwerte zwischen dem Originalausstrich und den Kulturausstrichen vorliegt, ist in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Bei den untersuchten Fällen handelt es sich in einem Fall um normales Knochenmark, in drei Fällen um hypochrome und in drei Fällen um hyperchrome Anämien, in einem Fall um eine lymphatische Leukämie und in je einem Fall um eine Monocytose und ein Rethothelsarkom. Bei dem letzteren wurde der Parallelversuch mit 5 % Glukosezusatz zu der Hank'schen Lösung durchgeführt.

ERGEBNISSE

Die Abbildung I zeigt die PAS-Positivität aller ausgewerteten Knochenmarkzellen im Sofortausstrich, 24-, 48- und 78-Stundenkultur. Dazu wurden insgesamt 31 193 Zellen ausgewertet. Die Versuchsreihe, die einen Glukosezusatz zu der Nährlösung erhielt, ist nicht mit in diese Abbildung hineingenommen worden. Die PAS-Indizes der Abb. I sind in Tabelle I aufgeführt, in der sich außerdem die dazugehörigen Signifikanzwerte finden.

Aus der Abb. I geht hervor, daß der Sofortausstrich die größte PAS-Positivität besitzt. Nach einem Tag in Kultur erfolgt ein erheblicher Abfall der PAS-Anfärbarkeit. Der PAS-Index fällt von 106,3 auf 50,5. Nach weiteren 24 Stunden in Kultur hat die PAS-Reaktion in den Zellen zwar noch weiter abgenommen, aber nicht so stark wie nach dem ersten Tag. Am dritten Tag steigt der PAS-Index wieder etwas an.

Die Versuchsserie mit 5 % Glukosezusatz war so wenig zellreich, daß nur je ein 24-, 48- und 72-Stunden-Präparat ausgewertet werden konnte. Durch diese Versuchsserie wurden insgesamt 3 238 Zellen erfaßt, die mit den 3 053 Zellen des gleichen Knochenmarkes verglichen werden können, welches keinen Glukosezusatz erhielt.

Abb. I.

Mittlere PAS-Indizes
aller Knochenmarkzellen
der Sofort-, 24-, 48- und 72-Stundenpräparate

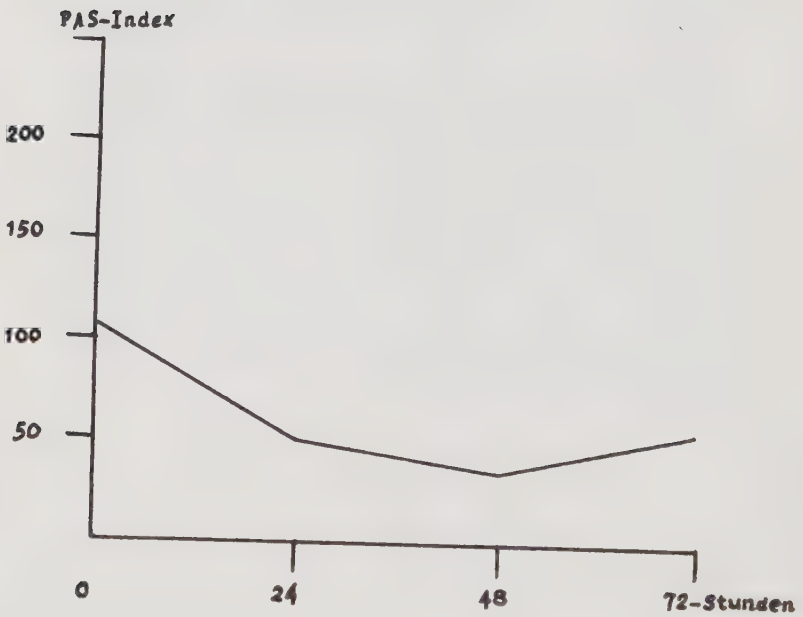


Tabelle I

	Mittlerer PAS-Index	t - Wert	c
Sofortausstrich	106,3	Sofort gegen 72 ^h 9,2	2,9
24 Stunden	50,5	24 ^h gegen Sofort 10,0	2,9
48 Stunden	45,1	48 ^h gegen 24 ^h 2,0	2,9
72 Stunden	59,8	72 ^h gegen 48 ^h 6,0	2,9

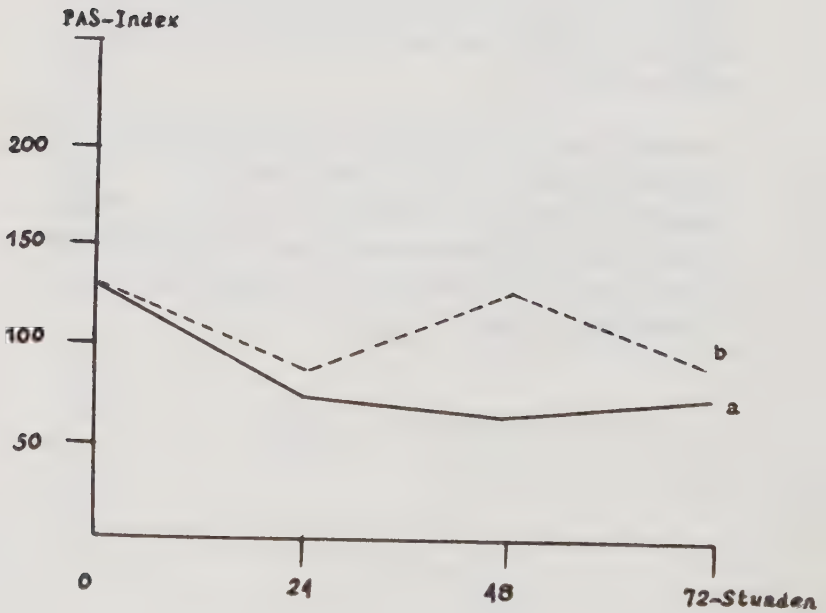
Da die t-Werte bis auf den 48-Stunden Ausstrich größer sind als die entsprechenden c-Werte, ist die Abnahme des PAS-Index am 1. Tag und die Zunahme am dritten Tag mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % als signifikant anzusehen.

Die Abbildung II zeigt die Färbeindizes des gleichen Knochenmarkes einmal ohne Glukosezusatz und einmal mit Glukosezusatz. Vergleicht man diese Färbeindizes mit denen aller ausgezählten Zellen (Abb. I), so ist ersichtlich, daß in einem Fall der Färbeindex aller ausgezählten Zellen etwas erhöht ist und nach Glukosezusatz zu der Nährlösung bis zum dritten Tage in der Kultur noch ansteigt, s. Abb. II:

Abb. II.

PAS-Indizes des Sofort-, 24-, 48- und
72-Stundenpräparates bei einem Retiothelsarkom

- a) ohne Glukosezusatz —————
b) mit Glukosezusatz - - - - -



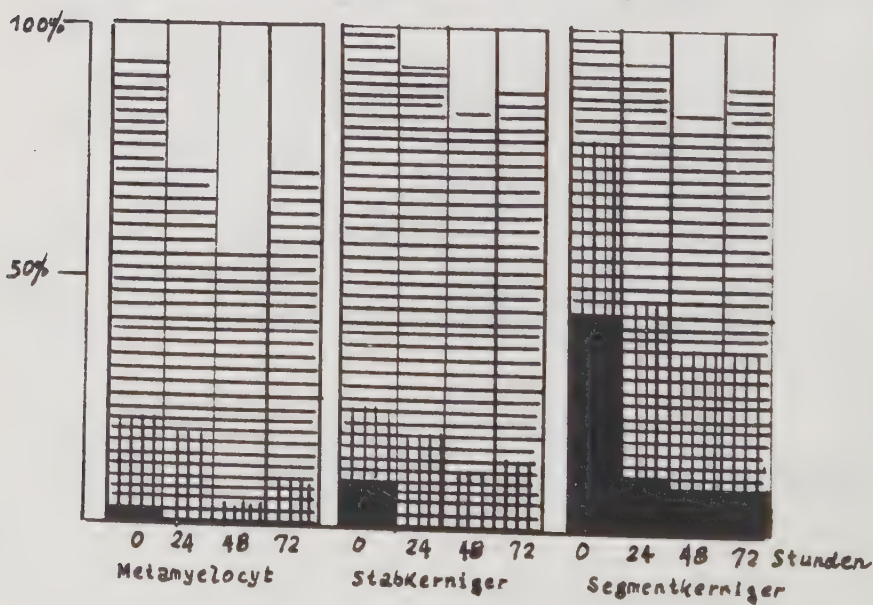
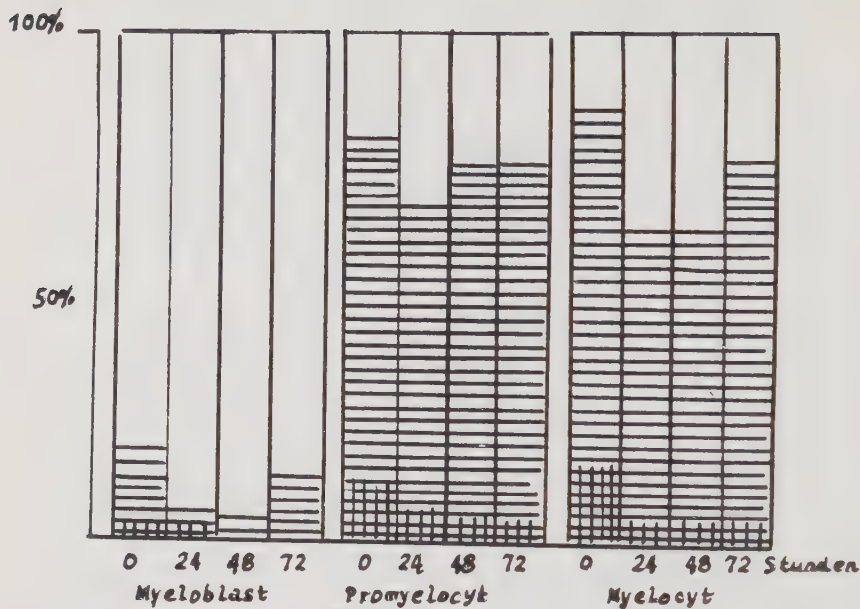
Die Aufstellung der Indizes sämtlicher Zellen der weißen Reihe (Abb. III) soll darlegen, wie stark die einzelnen Zellen der Granulopoese im Durchschnitt PAS-positiv sind. Weiter wird in der Abb. III dargestellt, ob es eine Gesetzmäßigkeit gibt, nach der sich der PAS-Gehalt der Zellen der weißen Reihe im Laufe von 3 Tagen in der Kultur verändert. Die unterschiedlichen PAS-Indices in der Granulopoese, vom Myeloblasten bis zum Segmentkernigen, sind in Säulen aufgetragen. Vier Säulen sind in je einer Säulengruppe zusammengefaßt, die dem Sofortausstrich und den Kulturausstrichen entsprechen.

Die unreifste Zelle der Granulopoese, der Myeloblast, weist die geringste PAS-Anfärbarkeit auf. Nur ein kleiner Prozentsatz der ausgewerteten Myeloblasten weist den Anfärbarkeitsgrad 100 auf. Der überwiegende Teil ist PAS-negativ. Beim Übergang vom Myeloblasten zum Promyelocyten ist eine sehr starke Zunahme der PAS-Positivität zu erkennen. Vom Promyelocyten erfolgt ein gleichmäßiger Zuwachs an PAS-positiven Substanzen bis zum Stabkernigen. Bei weiterer Reifung vom stab- zum segmentkernigen Granulocyten ist die Zunahme der Anfärbarkeit ähnlich sprunghaft wie beim Unterschied vom Myeloblasten zum Promyelocyten.

Wie schon aus den Abbildungen I und II hervorgeht, so wird auch bei dieser Darstellung deutlich, daß nach 24 Stunden Züchtungsdauer der größte Anfärbarkeitsverlust vorliegt. Bei weiterer Züchtung bis zu 48 Stunden zeigen alle Zellen keine Tendenz, ihre PAS-Positivität zu verändern. Der 72-Stunden-Ausstrich hat die Besonderheit, daß die PAS-Positivität wieder signifikant zunimmt (Tab. I). Nach Abb. III ist der PAS-Gehalt am dritten Tag der Züchtung jedoch niemals zugunsten der Stärke "300" erhöht. Alle Zellen beteiligen sich an der Zunahme der PAS-Positivität.

% der ausge-
zählten Zellen

Abb. III.



PAS-Index: 0



100+



200+



300+



Die Tabelle II gibt die mittleren PAS-Indizes und Signifikanzwerte der Zellen der Granulopoese in den Sofort-, 24-, 48- und 72-Stunden-Ausstrichen an.

Tabelle II.

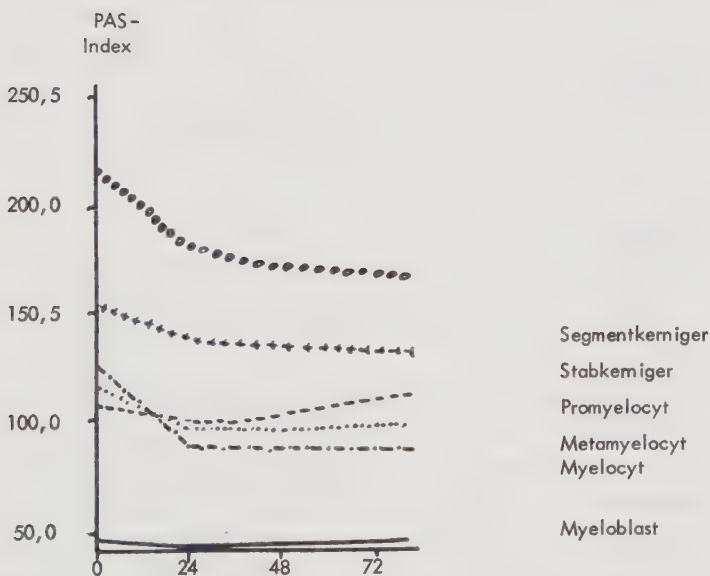
	Mittlerer PAS-Index	t - Wert	c
<u>Myeloblast</u>			
Sofortausstrich	18,3	Sofort gegen 72 ^h 2,7	2,9
24-Stunden	6,2	24 ^h gegen Sofort 0,8	2,9
48-Stunden	5,8	48 ^h gegen 24 ^h 0,1	2,9
72-Stunden	10,7	72 ^h gegen 48 ^h 1,4	2,9
<u>Promyelocyt</u>			
Sofortausstrich	88,0	Sofort gegen 72 ^h 0,1	2,9
24-Stunden	71,0	24 ^h gegen Sofort 0,06	2,9
48-Stunden	73,0	48 ^h gegen 24 ^h 0,6	2,9
72-Stunden	83,0	72 ^h gegen 48 ^h 0,4	2,9
<u>Myelocyt</u>			
Sofortausstrich	101,0	Sofort gegen 72 ^h 4,2	2,9
24-Stunden	61,0	24 ^h gegen Sofort 6,3	2,9
48-Stunden	60,0	48 ^h gegen 24 ^h 1,4	2,9
72-Stunden	65,0	72 ^h gegen 48 ^h 1,2	2,9

	Mittlerer PAS - Index	t - Wert	c
<u>Metamyelocyt</u>			
Sofortausstrich	116,0	Sofort gegen 72 ^h 0,1	2,9
24'-Stunden	79,0	24 ^h gegen Sofort 1,5	2,9
48-Stunden	60,0	48 ^h gegen 24 ^h 2,3	2,9
72-Stunden	74,0	72 ^h gegen 48 ^h 2,1	2,9
<u>Stabkerniger</u>			
Sofortausstrich	156,0	Sofort gegen 72 ^h 7,2	2,9
24-Stunden	119,0	24 ^h gegen Sofort 1,6	2,9
48-Stunden	105,0	48 ^h gegen 24 ^h 1,6	2,9
72-Stunden	121,0	72 ^h gegen 48 ^h 6,0	2,9
<u>Segmentkerniger</u>			
Sofortausstrich	223,0	Sofort gegen 72 ^h 7,3	2,9
24-Stunden	137,0	24 ^h gegen Sofort 8,0	2,9
48-Stunden	127,0	48 ^h gegen 24 ^h 13,0	2,9
72-Stunden	117,0	72 ^h gegen 48 ^h 7,2	2,9

Betrachtet man die in Tabelle II aufgeführten t- und c-Werte, so ergeben sich für die oben gemachten Ausführungen die zugehörigen Signifikanzwerte.

Die Abbildung IV zeigt die durchschnittlichen PAS-Indizes der Zellklassen in der Granulopoese im Sofortausstrich und bis zu einer Kultivierung von drei Tagen in Kurven dargestellt. Wie aus der Abbildung III schon hervorging, stellt sich in Abbildung IV, allerdings deutlicher, ein Mittelfeld an Zelltypen der Granulopoese dar, welches die Promyelocyten, Myelocyten und Metamyelocyten bilden. Unterhalb dieses Mittelfeldes steht der Myeloblast mit seinem sehr geringen PAS-Index von 18,3 und oberhalb des Mittelfeldes befindet sich der Stabkernige mit seinem PAS-Index von 156,0, darüber der Segmentkernige mit einem Index von 223. Der Anstieg des mittleren PAS-Index (Abb. I) nach 72 Stunden ist besonders durch erhöhte Indizes der Metamyelocyten und Promyelocyten bedingt (Abb. IV).

IV. PAS - INDIZES IN DER GRANULOPOESE



Die Tabelle III gibt die Färbeindizes und Signifikanzwerte der Erythropoese und die PAS-Indizes der übrigen differenzierten Zelltypen wieder. Auf die Signifikanzberechnungen bei den Monocyten, Lymphocyten, Plasmazellen und Megakaryocyten verzichten wir, weil zu wenig Zellen ausgewertet wurden.

Tabelle III

	Mittlerer PAS-Index	t - Wert	c
<u>Proerythroblast</u>			
Sofortausstrich	8,8	Sofort gegen 72 ^h 0,1	2,9
24-Stunden	5,6	24 ^h gegen Sofort 1,0	2,9
48-Stunden	7,4	48 ^h gegen 24 ^h 4,0	2,9
72-Stunden	4,8	72 ^h gegen 48 ^h 6,0	2,9
<u>Erythroblast</u>			
Sofortausstrich	8,4	Sofort gegen 72 ^h 7,8	2,9
24-Stunden	3,6	24 ^h gegen Sofort 6,0	2,9
48-Stunden	2,9	48 ^h gegen 24 ^h 2,3	2,9
72-Stunden	9,4	72 ^h gegen 48 ^h 4,9	2,9

Die Streubreite der Indizes dieser Zellen ist sehr groß, eine Signifikanz kann nicht in allen Fällen gefunden werden. Immerhin geht aus dieser Tabelle hervor, wie gering die Zellen der Erythropoese in der PAS-Reaktion angefärbt werden.

Die mittleren PAS-Indizes der übrigen Zelltypen seien hier angeführt:

	Sofort- ausstrich	24-Stun- den	48- Stunden	72- Stunden
Monocyt	40,8	49,1	27,1	40,6
Lymphocyt	12,6	3,5	4,5	5,3
Plasmazelle	23,3	8,3	8,1	9,8
Megakaryocyt	91,5	89,5	123,0	109,0

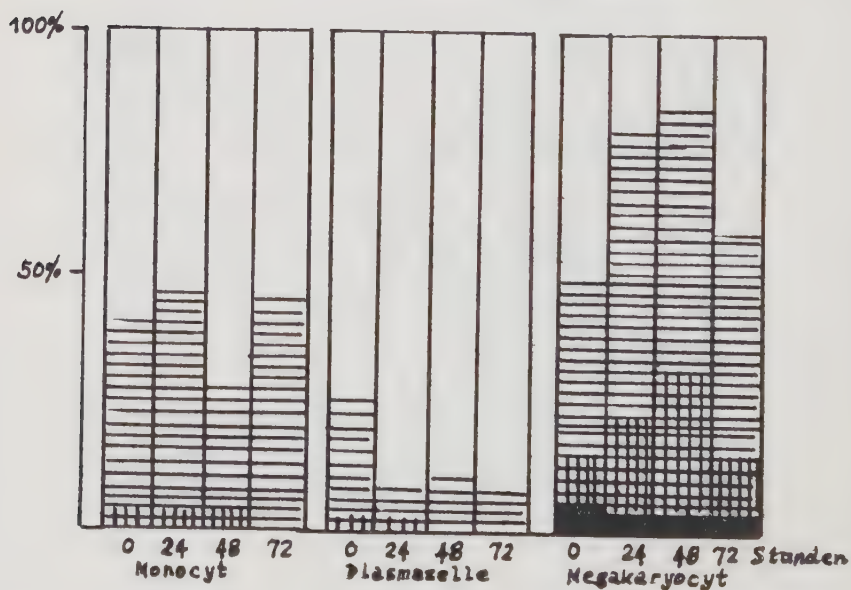
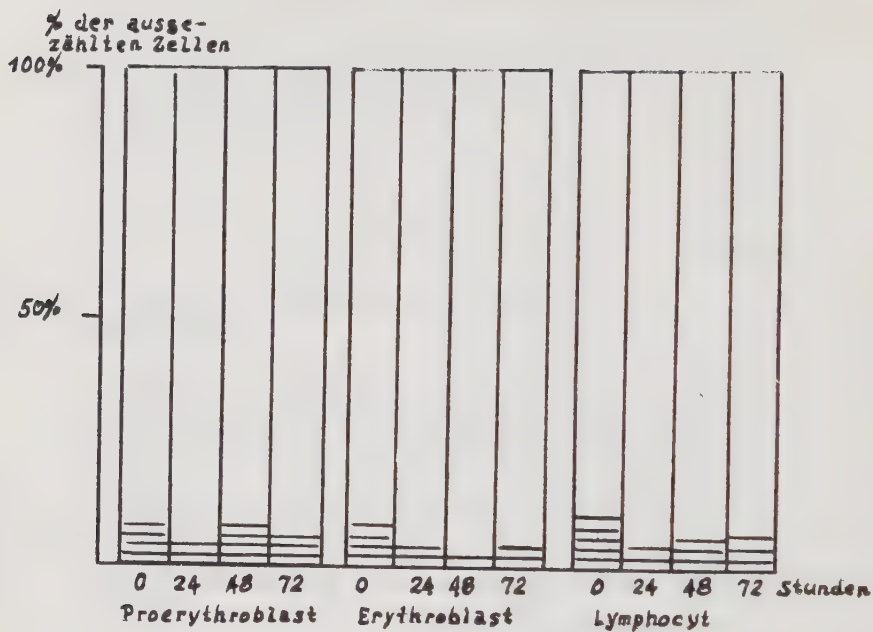
Die Verteilung der Anfärbbareitsgrade dieser in Tabelle III aufgeführten Zellen ist in Abbildung V dargestellt.

In der Erythropoese ist der Index im Sofortausstrich und allen anderen Präparaten etwa gleich groß. Vergleicht man die Anfärbbbarkeit der beiden Erythroblasten-Reifestufen bis zu einer Züchtung von drei Tagen, so stellt sich kein besonderer Unterschied in der PAS-Positivität heraus. Wurde bei der Granulopoese beobachtet, daß die Zellen mit zunehmender Reifung eine erhöhte PAS-Positivität aufweisen, so läßt sich dieses Phänomen für die Zellen der Roten Reihe nicht feststellen.

Der Lymphocyt ist ähnlich schwach angefärbt wie die Erythroblasten. Die PAS-Positivität nimmt während der Züchtung aber stärker ab und zwar entscheidend in den ersten Tagen der Kultur. Bei weiterer Züchtung bis zu drei Tagen tritt kein weiterer Verlust der Anfärbbbarkeit auf.

Der Monocyt ist bei weitem stärker angefärbt als der Lymphocyt. Vergleicht man die PAS-Indizes der Monocyten mit denen der Zellen der Granulopoese, so könnte man ihn in die Granulopoese einreihen. Mit seinem PAS-Index läge er dann zwischen der PAS-Positivität des Myeloblasten und des Promyelocyten.

Abb. V.



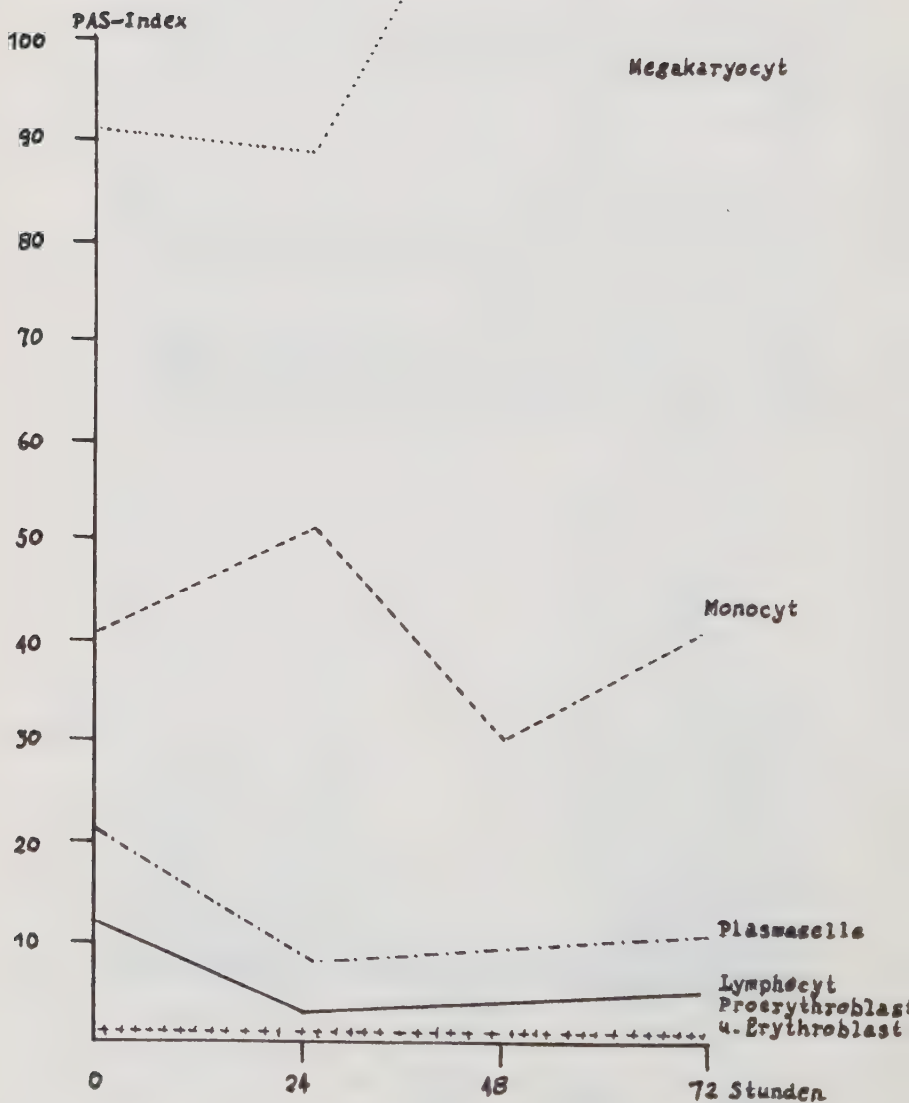
PAS-Index: 0= ++ =100 ++= =200 +++= =300

Die Plasmazelle ist im Sofortausstrich weniger PAS-positiv als der Monocyt und stärker angefärbt als der Lymphocyt. Wie beim Lymphocyt liegt der größte Anfärbbarkeitsverlust in den ersten 24 Stunden der Kultivierung vor. Bei weiterer Züchtung bis zu drei Tagen sind die Schwankungen in der PAS-Positivität unerheblich.

Der Megakaryocyt weist mit seinem Index eine geringere Anfärbbarkeit auf als die Ausführungen eingangs erwarten ließen. Mit seiner PAS-Positivität hat er nicht die stärkste PAS-Reaktion. Diese Stelle nimmt der Segmentkernige ein (Tab. II).

Die in Tabelle III aufgeführten PAS-Indizes sind in der Abbildung VI dargestellt. Die mittleren PAS-Indizes der Proerythroblasten und Erythroblasten weichen so wenig voneinander ab, daß sie in einer Kurve zusammengefaßt sind. Auffallend ist in der Abbildung VI, daß der Megakaryocyt im Gegensatz zu den übrigen Knochenmarkzellen in der Kultur nicht an PAS-Anfärbbarkeit verliert, sondern daß der PAS-Index bis zu 48 Stunden ansteigt, dann wieder etwas abfällt, aber am dritten Tag in der Kultur einen Index aufweist, der die PAS-Positivität im Originalausstrich noch übertrifft (s. Abb. VI).

Abb. VI.



Ein Vergleich der PAS-Positivität der einzelnen pathologischen Knochenmarkbilder mit den errechneten Durchschnittswerten aller ausgezählten Zellen führte zu folgenden Ergebnissen :

In Tabelle III sind die mittleren Färbeindizes und Signifikanzen aller ausgezählten Proerythroblasten und Erythroblasten aufgeführt. Tabelle IV zeigt im Vergleich dazu die mittleren PAS-Indizes in drei Fällen von hyperchromer und in Tabelle V die PAS-Indizes in drei Fällen von hypochromer Anämie.

T A B E L L E I V

Mittlere PAS-Indizes in drei Fällen von hyperchromer Anämie.

	Mittlerer PAS-Index	t - Wert	c
<u>Prömegaloblast</u>			
Sofortausstrich	8,5	Sofort gegen 72 h 7,8	3,9
24-Stunden	5,2	24 h gegen Sofort 1,0	3,9
48- Stunden	4,8	48 h gegen 24 h 4,0	3,9
72-Stunden	2,9	72 h gegen 48 h 4,0	3,9
<u>Megaloblast</u>			
Sofortausstrich	7,3	Sofort gegen 72 h 2,0	3,9
24-Stunden	7,7	24 h gegen Sofort 6,0	3,9
48-Stunden	1,4	48 h gegen 24 h 2,0	3,9
72-Stunden	8,3	72 h gegen 48 h 1,0	3,9

TABELLE V

Mittlere PAS-Indizes in drei Fällen von hypochromer Anämie.

	Mittlerer PAS-Index	t - Wert	c
<u>Proerythroblast</u>			
Sofortausstrich	15,0	Sofort gegen 72 h 3,4	3,9
24-Stunden	6,0	24 h gegen Sofort 1,0	3,9
48-Stunden	6,0	48 h gegen 24 h 3,0	3,9
72-Stunden	7,0	72 h gegen 48 h 1,0	3,9

<u>Erythroblast</u>			
Sofortausstrich	13,7	Sofort gegen 72 h 4,3	3,9
24-Stunden	7,0	24 h gegen Sofort 4,2	3,9
48-Stunden	7,0	48 h gegen 24 h 4,0	3,9
72-Stunden	8,8	72 h gegen 48 h 4,0	3,9

Bei den drei Fällen von hyperchromer Anämie wurden die Megaloblasten nicht als besondere Zellen differenziert, ihr PAS-Index mit denen der vorhandenen Erythroblasten miterfaßt. Die Werte der PAS-Indizes der hyperchromen und hypochromen Anämien weichen von den errechneten Durchschnittswerten aller ausgewerteten Zellen der Roten Reihe etwas ab (s. Tab. III, IV, V).

Die Indizes der Megaloblasten bei hyperchromer Anämie (Tab. IV) liegen niedriger als die Indizes der hyperchromen Anaemien.

Bei den hyperchromen Anämien liegen die PAS-Indizes teils unter teils über den Durchschnittswerten, so daß wir eine definitive Aussage hier nicht treffen können.

In der Tabelle VI wird der PAS-Index der Monocyten bei einem Fall von Monocytose mit den mittleren PAS-Indizes aller ausgezählten Monocyten unserer Versuchsserie (Abb. V, VI, Tab. III) verglichen.

T A B E L L E VI

	Mittlerer PAS-Index aller Monocyten	PAS-Index bei Monocytose
Sofortausstrich	40,8	36,2
24-Stunden	49,1	59,7
48-Stunden	27,1	13,2
72-Stunden	46,4	---

Der mittlere PAS-Index der Monocyten nimmt als einziger nach 24 Stunden in Vitro zu. Bei dem Knochenmark mit Monocytose liegt der Ausgangswert etwas tiefer, der 24-Stunden-Wert höher und der 48-Stunden-Wert wieder niedriger als der Mittelwert, so daß wir bei einem Fall von Monocytose keine Schlüsse ziehen können. Da uns leider für die Untersuchungen nur ein Fall von Monocytose zur Verfügung stand, ließ sich eine Signifikanz nicht errechnen.

Als letztes pathologisches Knochenmark sei der PAS-Gehalt der Lymphocyten bei einer chronisch-lymphatischen Leukämie untersucht. Der PAS-Index der Lymphocyten wurde in der Tabelle VII mit dem mittleren PAS-Index aller ausgezählten Lymphocyten verglichen (s. auch Abb. V, VI, Tab. III). Wie aus der Tabelle VII hervorgeht, liegt der PAS-Index der

Lymphocyten bei chronisch-lymphatischer Leukämie niedriger als der mittlere PAS-Index der normalen Lymphocyten. Da auch hier nur ein Fall von chronisch-lymphatischer Leukämie zu untersuchen war, ließ sich eine Signifikanz nicht errechnen. Der Unterschied ist aber evident.

T A B E L L E VII

	Mittlerer PAS-Index der Lymphocyten	Index der Lymphocyten bei chron.-lymphat. Leukämie
Sofortausstrich	12,6	0,00
24-Stunden	3,5	0,02
48-Stunden	4,5	0,00
72-Stunden	5,3	0,00

DISKUSSION

Wie aus den Abbildungen und Tabellen hervorgeht, ist die PAS-Anfärbbarkeit der einzelnen Zellen der Hämatopoese sehr verschieden. Bei der Kultivierung auf dem Koagulum kommt es in den ersten 24 Stunden zu einem allgemeinen Abfall der PAS-Positivität, aber stets ist bis zum dritten Tage der Kultivierung in den Zellen, die schon im Sofortausstrich PAS-positiv sind, noch eine PAS-Anfärbbarkeit vorhanden. Der mittlere Abfall der PAS-Färbbarkeit beträgt in den ersten 24 Stunden 55,8, und ist signifikant (Tab. I). Daß bis zum dritten Tage in der Kultur die PAS-Reaktion positiv ausfällt, steht der Beobachtung von Hertl⁽¹¹⁾ entgegen, der bei sämtlichen Zellen des Knochenmarks nach 24 Stunden eine PAS-Negativität verzeichnet. Diese unterschiedlichen Beobachtungen mögen einmal in der unterschiedlichen Kultivierungstechnik liegen, zum anderen in der unterschiedlichen Empfindlichkeit der durchgeführten PAS-Reaktion. Wie eingangs ausgeführt, sind Schwankungen der Anfärbbarkeit auf die unterschiedliche Zusammensetzung einiger Reagenzien zurückzuführen. Um nur ein Beispiel auszuführen, sei auf die Beobachtung hingewiesen, daß eine stärkere Oxydation durch eine höherprozentige Perjodsäure einen stärkeren Ausfall der PAS-Reaktion zur Folge hatte und umgekehrt.

Unserer Beobachtung, daß der größte Verlust der PAS-Anfärbbarkeit in den ersten 24 Stunden der Kultivierung zu verzeichnen ist, entspricht auch das Ergebnis von Aune, Gartner und Wase⁽³⁾, die am Blut feststellen, daß der größte Verlust der PAS-Positivität zwar nach 10 Stunden zu beobachten ist, aber danach noch PAS-positive Strukturen in den Zellen dargestellt werden können.

Da wir durch einen erhöhten Glukosegehalt der Hank'schen Lösung einen wenn auch geringen Zuwachs an PAS-färbbaren Substanzen verzeichnen, nehmen wir an, daß das Glukoseangebot im Medium auch eine Rolle für den Ausfall der PAS-Reaktion spielt. Einen mit der Differenzialzählmethode nachweisbaren Einfluß auf die Überlebensdauer von Knochenmarkzellen in der Kultur hatte die erhöhte Glukosezufuhr nicht. Es ist allerdings bei dem hohen Glykolysestoffwechsel der Granulopoese denkbar, daß sich eine gewisse Verarmung an Glykogen bei glukosearmen Medium ungünstig auf die Überlebensrate auswirkt.

Betrachten wir nun das Verhalten der myelopoetischen Zellen im Einzelnen: Die PAS-Anfärbbarkeit der Zellen der roten Reihe liegt nach unseren Ergebnissen höher als die Ausführungen anderer Autoren erwarten lassen. Soll nach A s t a l d i ⁽¹⁾ und M e r k e r ⁽¹⁵⁾ normalerweise der Proerythroblast und der Erythroblast PAS-negativ sein, so können wir feststellen, daß in allen Fällen eine, wenn auch geringe, Anzahl der Zellen der Erythropoese positiv reagieren.

Bei den Fällen von hyperchromer Anämie entsprechen unsere Beobachtungen auch nicht den Angaben von M e r k e r ⁽¹⁵⁾, daß bei den Megaloblasten der Norm entsprechende Verhältnisse vorliegen. Wir stellen vielmehr fest, daß die PAS-Positivität bei hyperchromen Anämien niedriger liegt als bei den ermittelten Durchschnittswerten in den Zellen der Erythropoese und daß dieser erniedrigte PAS-Index konsequent bis zum dritten Tag in der Kultur zu beobachten ist.

Grundsätzlich bestätigen können wir die Feststellung von M e r k e r ⁽¹⁵⁾, daß die Zellen der Granulopoese mit zunehmender Reifung einen steigenden PAS-Gehalt aufweisen. Wenn M e r k e r ⁽¹⁵⁾ angibt, der größte Zuwachs an PAS-Färbbarkeit liegt in der Granulopoese beim Stabkernigen, so sind wir allerdings anderer Meinung. In der Granulopoese gibt es nicht nur eine, sondern zwei Zellklassen, bei denen die PAS-Positivität sprunghaft zunimmt. Die eine davon ist der Promyelocyt, die andere nicht der Stabkernige, sondern der Segmentkernige. Bei der Ausreifung vom Stab- zum Segment-

kernigen Granulocyten steigt der PAS-Index mit einem Zuwachs von 67 am stärksten. Bei der Entwicklung vom Promyelocyten über den Myelocyten zum Metamyelocyten ist der Zuwachs der PAS-Positivität sehr gleichmäßig und steigt nur mit einem Index von 20 pro Zellklasse (s. Tab. II).

Allen Zellen der weißen Reihe ist gemeinsam, daß der 72-Stundenausstrich eine stärkere PAS-Positivität besitzt als der 48-Stundenausstrich, besonders zugunsten der Metamyelocyten und Stabkernigen. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß nach einer längeren Zeit in der Kultur vorrangig die Zellen der weißen Reihe verschwinden, die einen niedrigeren Gehalt an PAS-positiven Substanzen haben und damit im 72-Stundenausstrich die Zellen überwiegen, die einen höheren PAS-Index haben. Auch die am zweiten und dritten Kulturtage offensichtlich in vitro neugebildeten Segmentkernigen zeigen eine, wenngleich gegenüber dem Originalpräparat leicht abgeschwächte PAS-Reaktion. Wir müssen deswegen annehmen, daß auch die in vitro ausreifenden Zellen der Granulopoese PAS-positiven Substanzen einlagern können und somit aktive Stoffwechselleistungen durchführen.

Nach A s t a l d i ⁽¹⁵⁾ können die Lymphocyten teils positiv, teils PAS-negativ reagieren. U n d r i t z ⁽¹⁸⁾ stellt fest, daß die Lymphocyten im Mittel zu 21 % PAS-positiv sind. Bei unseren Untersuchungen sind die Lymphocyten zu 8 % PAS-positiv.

Bei dem von uns in der PAS-Reaktion untersuchten Fall von chronisch lymphatischer Leukämie finden sich nur noch bis zum ersten Tage in der Kultur einige PAS-positive Lymphocyten, danach liegen die Lymphocytenindizes bei dieser Erkrankung immer niedriger als die ermittelten Durchschnittswerte (Tab. VII).

Die Monocyten sollen nach M e r k e r ⁽¹⁵⁾ großen Schwankungen in ihrer PAS-Positivität unterliegen und etwas stärker angefärbt sein als die Promyelocyten in der Granulopoese. Beide Beobachtungen müssen wir einschränken. Große Schwankungen weisen die Monocyten in ihrer PAS-Positivität nicht auf.

Die meisten Monocyten sind PAS-positiv, allerdings in der geringsten Anfärbbarkeitsstufe "100".

Die Beobachtung, daß die Plasmazellen normalerweise nie PAS-positiv reagieren, sondern nur beim Plasmocytom PAS-positive Strukturen aufweisen, können wir nicht bestätigen. In allen untersuchten Fällen, in denen kein Plasmocytom vorlag, reagieren die Plasmazellen im Durchschnitt mit einem wenn auch niedrigen Index von 23 PAS-positiv (Tab. III). Leider hatten wir nicht die Gelegenheit, ein Plasmocytom zu untersuchen.

Was die PAS-Reaktion in den Megakaryocyten angeht, so muß gesagt werden, daß die Ergebnisse nur mit Vorbehalt zu werten sind, da der Megakaryocyt in den Knochenmarkausstrichen zahlenmäßig nur gering vertreten ist und damit eine fundierte Aussage wegen der geringen Zellzahl kaum möglich ist. Auffällig ist jedoch, daß dieser Zelltyp nach einer Züchtung bis zu drei Tagen eine größere PAS-Positivität besitzt als er im Originalausstrich hat (Abb. VI). Mit seinem PAS-Index liegt er aber deutlich unter der PAS-Positivität des Segmentkernigen (Tab. II). Diese Beobachtung steht der von Merker entgegen, der feststellt, daß der Megakaryocyt die größte PAS-Positivität besitzt (15).

ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer modifizierten Methode nach Hotchkiss-Mc Manus wurde die PAS-Reaktion am Knochenmark in 10 Fällen verschiedener hämatologischer Erkrankungen bzw. relativ normalem Knochenmark und an deren Knochenmarkkulturen während der ersten drei Tage *in vitro* durchgeführt. Die Intensität der Anfärbung wurde in vier Stufen eingeteilt und an den Zellen jedes Präparates einzeln differenziert. Dadurch konnte ein mittlerer PAS-Index für jede Zellart angegeben werden.

Unsere Befunde im Originalausstrich stimmen nicht für alle Zellen mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein: Die stärkste Anfärbbarkeit in der PAS-Reaktion zeigte in unserem Material der Segmentkernige, der selbst noch den Megakaryocyten übertrifft. Die Monocyten und Promonocyten zeigen in unserem Material eine geringere Anfärbbarkeit mit dem PAS-Reagens als die Promyelocyten. Die Erythroblasten weisen eine, wenn auch geringe PAS-Reaktion auf, die bei den Megaloblasten der perniziösen Anämie noch niedriger ist. Erniedrigte PAS-Indizes finden wir ebenfalls in den Lymphocyten bei einem Fall von chronisch lymphatischer Leukämie.

In der Koagulumkultur findet sich in allen Zellen, mit Ausnahme des Megakaryocyten und Monocyten, ein Rückgang des PAS-Index auf etwa die Hälfte nach 24 Stunden. Am dritten Tage der Kultivierung ist ein Wiederanstieg zu beobachten, teilweise durch die Abnahme unreifer, relativ schwach PAS-positiver Granuloblasten. Der *in vitro* immer noch starke, wenn auch gegenüber dem Originalausstrich verringerte PAS-Gehalt der Granulocyten, zeigte, daß die offensichtlich *in vitro* neugebildeten Zellen aktive Stoffwechselleistungen vollbringen können.

Eine Erhöhung des Glukosezusatzes zum Kultumedium brachte einen geringeren Abfall des PAS-Index nach 24 Stunden. Wenn H e r t l nach 10-stündiger Kultivierung keine PAS-positiven Substanzen mehr in den Knochenmarkzellen beobachten konnte, so möchten wir dieses durch eine andere Kulturtechnik oder durch eine geringe Anfärbung mittels einer anderen Methode deuten.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ASTALDI, G., STROSSELLI, E., SAULI, S.:
 Histomedical Research on Erythroblast-
 PAS-POSITIVITY under Various Patholo-
 gical Conditions. Qualitative an quanti-
 tative Cytochemistry, Proc. 9th Cgr. europ.
 Soc. Haemat., Lisbon 1963
 (S. Karger, Basel, New York)

- 2) ASTALDI, G.:
 Sul Contenuto Glikogeno dei Granuloblasti
 Della Leukemia Mieloide Chronica Sopravi-
 venti in vitro e Sottoposti Ad Irradiazione
 Roentgen. Dal Bolletino Della Societa Ita-
 liana Di Biologica Sperimentale. Volume
 XXXIII, Fasc. 10-12-11-Ste. 1442 (1957)

- 3) AUNE, J. M., GARTNER, G. E., WASE, N. J.:
 Sequence of Events Terminating in Death of
 Leukocytes. Brit. J. Haemat. 13, 815 (1967)

- 4) BOLL, I.:
 Morphologische Studien im Verhalten von
 Knochenmarkzellen in vitro. "Folia haema-
 tologica" Neue Folge, 3, 1/1958.

- 5) BRUHN, H. D.:
 Zur Anwendung der PAS-Reaktion bei der
 Diagnose der unreifzelligen Monocytenleu-
 kämie.
 Blut, Bd. XI/1965

- 6) GAHRTON, G.: A Quantified Periodic Acid-Schiff-Reaktion in Normal and Leukemic Leukocytes.
Europ. J. Canc. 1, 299/1965

- 7) GAHRTON, G. und ZELLERBERG, A.: Glykogen Synthesis in Normal, Leucemic and Polycythemic Leukocytes.
Prelim. Report of a Quantitative Cytochemistry Study. Acta med. scand. 180:497/1966

- 8) HAYHOE, F. G. J.: Handbuch der gesamten Hämatologie. (Heilmeyer) 3. Bd. 1. Teil
Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1956

- 9) HECKNER, F.: Handbuch der gesamten Hämatologie (Heilmeyer). 2. Bd. 2. Teil, 2. Halbband. Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956

- 10) HEILMEYER, L.: Handbuch der gesamten Hämatologie. Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg. 1956

- 11) HERTL, M., KLAUS, Th.: Cytochemische Untersuchungen an Knochenmarkszellen in der Kultur. Folia Haematol. Neue Folge, 3,4 1959

- 12) KAHN, P.: Kann die PAS-Färbung eine differentialdiagnostische Bedeutung für die Lympho-Mono- und Myeloblastenleukämie haben? Dtsch. Med. Wochenschrift, Bd. II, 1031/1965

- 13) LAMBERS, K. : Zyto- und Histochemie in der Hämatologie.
Neuntes Freiburger Symposium (Merker).
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1963.

- 14) LEHNARTZ, E. : Biochemisches Taschenbuch, neubearbeitet
von v. Raven. Verlag Springer Berlin-
Göttingen-Heidelberg 1956

- 15) MERKER, H. : Zyto- und Histochemie in der Hämatologie.
Neuntes Freiburger Symposium. Springer-
Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

- 16) SPANNHOF, L. : Einführung in die praktische Histochemie,
Verlag G. Fischer, Jena 1964

- 17) ŠKRABALO, Z. : STAVRINIĆ, A., ČREPINKO, I., JAKSIC, Z. :

PAS-positive Substances in Peripheral Blood,
Leukocytes in Boarder Line Cases of Diabetes.
Europ. Association for the Blood Research.
43/82 (1967)

- 18) UNDRITZ, E. : Die Alius Grignaschi-Anomalie: Der erblich
konstitutionelle Peroxydasedefekt der Neutro-
philen und Monocyten. Blut, XIV, 129 (1966)

Nachwort:

Frau Oberarzt Dr. med. I. Boll danke ich vielmals für die Überlassung des Themas sowie für die Anleitung bei der Durchführung der Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 8. Dezember 1941 wurde ich, Hendrik Bruns, als Sohn der Eheleute Theodor Bruns und Gertrud Bruns, geborene Overbeck, in Kleve geboren. Ich habe die deutsche Staatsangehörigkeit.

Nach vierjähriger Grundschulausbildung und anschließendem Besuch des Staatlichen Gymnasiums in Kleve legte ich am 22. 2. 1962 das Abitur ab.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester an der Universität Freiburg. Danach schloß sich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin an, welches durch ein Semester an der medizinischen Fakultät Wien unterbrochen wurde. Im März 1968 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin ab.

Seit Juli 1968 bin ich als Medizinalassistent tätig.

Hendrik Bruns

